

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-224559

(43)Date of publication of application : 13.08.1992

(51)Int.Cl.

C07D213/30  
A61K 31/44  
C12P 17/12  
// (C12P 17/12  
C12R 1:645 )

(21)Application number : 02-418234

(22)Date of filing : 26.12.1990

(71)Applicant : FUJISAWA PHARMACEUT CO LTD

(72)Inventor : SHIBATA TOSHIHIRO

YAMASHITA MICHIO

TAKASE SHIGEHIRO

TERANO HIROSHI

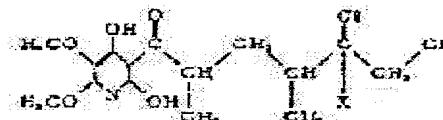
OKUHARA MASAKUNI

(54) ARTERIALIZATION-INHIBITING SUBSTANCE FR-901448 AND FR-901449

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain an arterialization-inhibiting agent such as an antiulcer agent containing FR-901448 substance and FR-901449 (new) substance obtained by culturing a microorganism belonging to the genus Chaetobolus as an active ingredient.

CONSTITUTION: An arterialization-inhibiting agent containing a compound expressed by the formula (X is H or Cl) as an active ingredient is produced. The compound expressed by the formula is obtained by culturing FR-901448 substance and FR-901449 substance-producing mold belonging to the genus Chaetobolus and the FR-901449 substance therein is a new substance.



7/7

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-224559

(43) 公開日 平成4年(1992)8月13日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 D 213/30		6701-4C		
A 6 1 K 31/44	ADU	7252-4C		
C 1 2 P 17/12		2104-4B		
// (C 1 2 P 17/12				
C 1 2 R 1:645)				

審査請求 未請求 請求項の数3(全11頁)

(21) 出願番号 特願平2-418234

(22) 出願日 平成2年(1990)12月26日

(71) 出願人 000005245

藤沢薬品工業株式会社

大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号

(72) 発明者 柴田 敏裕

茨城県つくば市梅園 2-16-1 ルンビ

一二梅園305

(72) 発明者 山下 道雄

茨城県つくば市並木 3-11-11

(72) 発明者 高瀬 茂弘

茨城県石岡市総社 1-12-10

(72) 発明者 奥原 正国

茨城県つくば市梅園 2-14-10

(74) 代理人 弁理士 戸田 親男

最終頁に続く

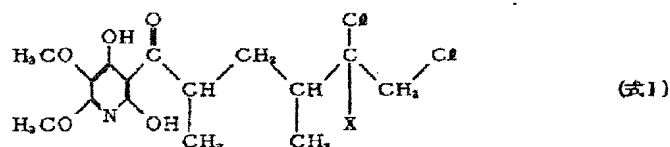
(54) 【発明の名称】 血管新生阻害物質 FR-901448 およびFR-901449

(57) 【要約】

【構成】 ケトアスポリシア (Chaetasbolis ia) 属に属する微生物を培養して、化1の式1で示

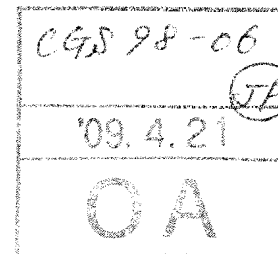
されるFR-901448物質及びFR-901449物質を製造する。

【化1】



(但し、式中Xは水素原子 (FR-901448物質の場合) 又は塩素原子 (FR-901449物質の場合) を表わす。)

【効果】 血管新生阻害剤としてすぐれている。



1

2

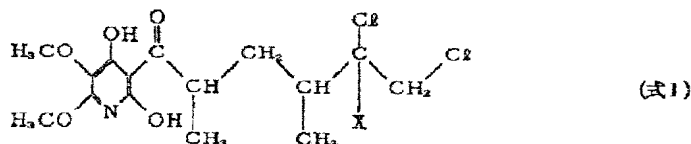
【特許請求の範囲】

\*を有効成分とすることを特徴とする血管新生阻害剤。

【請求項1】 下記化1の式Iで示される化合物、FR-

【化1】

901448物質及び/又はFR-901449物質、\*



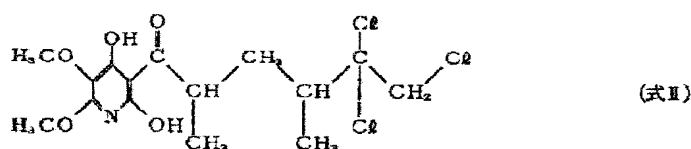
(式I)

(但し、式中Xは水素原子(FR-901448物質の場合)又は塩素原子(FR-901449物質の場合)を表わす。)

【請求項2】 下記化2の式IIで示されるFR-90

※

1449物質。



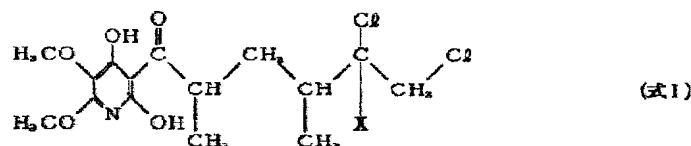
(式II)

【請求項3】 ケトアスポリシア (Chaetasia) 属に属するFR-901448物質及びFR-901449物質生産菌を培養してFR-901448物質及びFR-901449物質を生成せしめ、これ(ら)を採取することを特徴とするFR-901448物質及び/又はFR-901449物質の製造方法。

★8物質及び/又はFR-901449物質の製造方法。

【請求項4】 下記化3の式Iで示される化合物、FR-901448物質及び/又はFR-901449物質、を有効成分とすることを特徴とする抗腫瘍剤。

【化3】



(式I)

(但し、式中Xは水素原子(FR-901448物質の場合)又は塩素原子(FR-901449物質の場合)を表わす。)

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、FR-901448物質、FR-901449物質(それぞれWF16775-A<sub>1</sub>、同A<sub>2</sub>という場合もある)を有効成分とする血管新生阻害剤に関するものである。

【0002】 また本発明はこれらの物質の新規な製造方法にも関するものである。これらの物質の内、FR-901449物質は文献未載の新規物質である。

【0003】 これらの物質は、すぐれた血管新生阻害作用を有しており、制癌剤をはじめ各種の医薬として有用である。

【0004】

【従来の技術】 生体内において血管が新生するのを抑制ないし阻害することは、生理学的見地から非常に重要な意義を有する。例えば、癌細胞またはその周辺細胞における血管の新生を阻害すれば、これ(ら)の細胞に対して酸素や各種の栄養成分が運ばれなくなるため、結局死滅せざるを得なくなり、間接的に、癌細胞を征圧することとなる。したがって、すぐれた血管新生阻害剤はすぐれた制癌剤として大いに期待することができる。

30 【0005】 本発明に係る物質は、血管内皮細胞に対する管腔形成阻害を指標として血管新生阻害物質をスクリーニングする過程において発見されたものであるが、これらFR-901448及びFR-901449物質のようなピリジン系誘導体が血管新生阻害作用を有することは、従来知られておらず新規である。

【0006】 上記のように作用の面からみても本発明は新規であるが、物質の面からみても本発明は新規であつて、FR-901449物質は新規化合物である。また、FR-901448物質は既知の化合物であつて(The Journal of Antibiotics, VOL. XLIII, No. 9, 1064-1068 (1990))、その抗カビ作用は明らかにされているけれども、血管新生阻害作用については全く何も開示されていない。

【0007】 また、本発明は、これらFR-901448及びFR-901449物質をケトアスポリシア属菌を培養することによって製造する方法にも関するものであるが、このような方法も全く知られておらず新規である。すなわち、FR-901449物質は新規物質であるから、当然のことながらそれを製造する本発明方法は

新規であるし、またFR-901448物質はPenicillium sp. FO-125の生産する抗カビ性抗生物質であることが知られているが(上掲文献)、本発明のようにケトアスポリシア属菌によって生産されることは全く知られていない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、安全性が高くしかもきわめて有効な血管新生阻害剤ないし抗腫瘍剤を開発する目的でなされたものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は、上記した目的を達成するためになされたものである。

【0010】そこで、本発明者らは、安全性の面から天

然物に着目し、微生物の醗酵生産物に注目するに至り、各種微生物を検索した結果、石川県白山山中で採取された土壌から新たに分離したフィアロビクニディア亜目に属する糸状菌No. 16775株がその菌体内に目的物質を蓄積することを発見した。そして更にこの物質についてその理化学的性質を詳細に研究した結果、2種類の物質からなることを発見し、これらをWF16775-A<sub>1</sub>及びWF16775-A<sub>2</sub>とそれぞれ命名し、更に検討を行い本発明を完成するに至った。

10 【0011】本発明に係るWF16775-A<sub>2</sub>物質は、下記表1の理化学的性質を有している。

【0012】

【表1】

WF16775-A<sub>2</sub>物質の理化学的性質

(1) 物質の色及び状態

無色針状結晶

(2) 融点

119~121℃

(3) 比旋光度

$[\alpha]_D^{25} : -7.1 \pm 0.3^\circ$  (C=1.0, メタノール)

(4) 分子式

$C_{15}H_{20}Cl_2NO_8$

(5) 元素分析

計算値(%) ( $C_{15}H_{20}Cl_2NO_8$ に対し):

C, 44.96; H, 5.03; N, 3.50; Cl, 26.55

実測値(%): C, 45.13; H, 4.97; N, 3.49; Cl, 26.67

(6) 溶剤に対する溶解性

クロロホルム、酢酸エチル、ジメチルスルホキシドに易溶;

n-ヘキサンに難溶;

水に不溶。

(7) 呈色反応

硝酸セリウム反応: 陽性

ヨード反応: 陽性

塩化第二鉄反応: 陽性

エーリッヒ反応: 陰性

ニンヒドリン反応: 陰性

モーリッシュ反応: 陰性

(8) 薄層クロマトグラフィー

固 定 相	展 開 溶 媒	Rf値
Kieselgel 60 F <sub>254</sub> (Merck社製)	n-ヘキサン: 酢酸エチル (1:1)	0.50
0.25mm	クロロホルム: メタノール (25:1)	0.52
RP-18 WF <sub>254</sub> S (Merck社製)	10mMリン酸カリウム 緩衝液(pH7)含有	0.34
0.2mm	80% メタノール水溶液	

(9) 紫外吸収スペクトル

$\epsilon_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ : 3100, 3000, 2900, 2840, 1640, 1610, 1490, 1330, 1280, 1210,  
1160, 1150, 1000, 960 $\text{cm}^{-1}$

## (10) 紫外線吸収スペクトル

 $\lambda_{\text{max}}^{\text{メタノール}} m(\epsilon): 322 (7,200), 270 (8,400), 235 (12,600)$ 
 $\lambda_{\text{max}}^{\text{メタノール-HCl}} m(\epsilon): 322 (8,400), 270 (9,600), 235 (14,600)$ 
 $\lambda_{\text{max}}^{\text{メタノール-NaOH}} m(\epsilon): 350 (4,000), 292 (11,200), 245 (11,400)$ 
(11)  $^1\text{H}$ 核磁気共鳴スペクトル(400MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CDCl}_3$  (5:1))
 $\delta \text{H}: 4.17 (2\text{H}, m), 4.03 (1\text{H}, m), 3.99 (3\text{H}, s), 3.72 (3\text{H}, s),$   
 $2.51 (1\text{H}, m), 1.83 \sim 1.70 (2\text{H}, m), 1.17 (3\text{H}, d, J=6.5\text{Hz}),$   
 $1.14 (3\text{H}, d, J=6.5\text{Hz}).$ 
(12)  $^{13}\text{C}$ 核磁気共鳴スペクトル(100MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}-\text{CDCl}_3$  (5:1))
 $\delta: 210.9 (s), 166.6 (s), 162.5 (s), 160.0 (s), 124.7 (s), 100.5 (s),$   
 $97.9 (s), 61.5 (q), 55.9 (q), 54.1 (t), 43.2 (d), 42.4 (d),$   
 $36.1 (t), 16.8 (q), 14.9 (q).$ 

## (13) 物質の酸性、塩基性の区分

酸性物質

## (14) 分子量

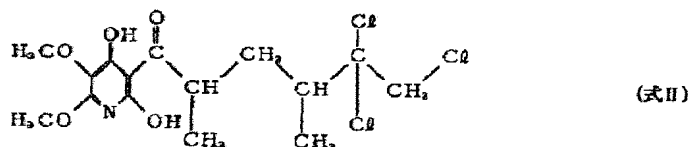
FAB-MS  $m/z$  400 ( $(\text{M}+\text{H})^+$ );HRFAB-MS  $m/z$  400.0488.(C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>Cl<sub>2</sub>NO<sub>2</sub> + H の計算値 400.0485)

【0013】このような理化学的性質を有する物質は従来知られておらず、新規物質であることが確認された。そしてこの新規物質であるWF16775-A<sub>2</sub>物質について、その化学構造の決定を試みた結果、それに成功\*

\*し、このWF16775-A<sub>2</sub>物質の構造式を下記化4の式I Iのように決定した。

【0014】

【化4】



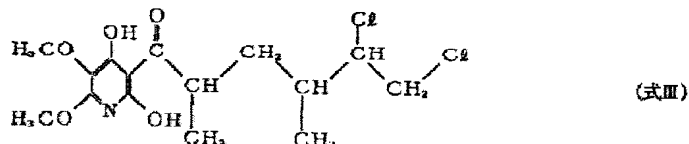
(式II)

【0015】また本発明方法においては、上記したWF16775-A<sub>2</sub>物質とともにWF16775-A<sub>1</sub>物質も生産され、その構造決定を行った結果、下記化5の※

※式I I Iで示される化合物であることが判明した。

【0016】

【化5】



(式III)

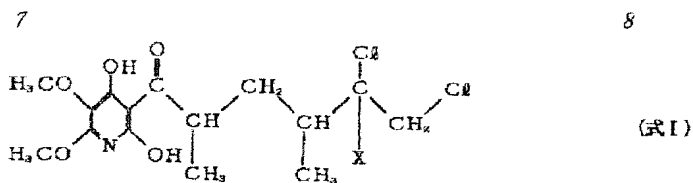
【0017】この式I I Iで示される構造式を有するWF16775-A<sub>1</sub>物質がベニシリウム属菌の醗酵生産物として既に知られている物質であることは、先に述べたとおりである。

【0018】このようにして、WF16775-A<sub>1</sub>及び同A<sub>2</sub>物質の構造決定に伴ない、これらの物質を改めてそれぞれFR-901448及びFR-901449物質と命名し、以後、この名称も使用する場合があります。

40 【0019】本発明において使用するWF16775物質(WF16775-A<sub>1</sub>及びA<sub>2</sub>の総称)は、下記化6の式Iで示される構造を有するものであって、本発明者らが石川県白山で採取した土壌から新たに分離した糸状菌No. 16775によって生産される。

【0020】

【化6】



(但し、式中

Xが水素原子の場合：WF16775-A<sub>1</sub> (FR-901448)、

Xが塩素原子の場合：WF16775-A<sub>2</sub> (FR-901449)

をそれぞれ表わす。)

【0021】糸状菌No. 16775株はケトアスポリ  
シア属に属するものと認められ、ケトアスポリシア・エ  
リシホイデスNo. 16775 (*Chaetobolisia*  
*erysiphoides* No. 1677  
5)と命名された。

【0022】本菌株の凍結乾燥サンプルは、工業技術院  
微生物工業技術研究所(〒305、茨城県つくば市東1  
-1-3)へFERM P-11873の番号で寄託さ  
れた。(寄託日=1990年11月29日)

【0023】WF16775物質の生産は、単に説明を  
目的として挙げただけの本明細書記載の特定の微生物の  
使用に限定されるものでないことを理解すべきである。  
この発明は、記載の微生物からX線照射、紫外線照射、  
N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、  
2-アミノプリン等の変異処理により取得できる人工変  
異株並びに自然変異株を含めてWF16775物質を生  
産しうる全ての変異株の使用をも包含するものである。

【0024】本菌株(No. 16775株)は、各種培  
地上でやや抑制的に広がり、暗茶色の集落を形成する。  
No. 16775株は、各種培地上で、分生子殻のアナ  
モルフを形成した。その分生子形成様式はフィアロ型で  
あった。またテレオモルフは形成しなかった。これらの  
形態的特徴から、No. 16775株はフィアロピクニ  
デア亜目(the suborder *Phialo*  
*pycnidiineae* Sutton 1980)  
に所属すると思われる。

【0025】以下に、本菌の菌学的性質を示す。

【0026】各種培地上での培養性状を下記表2に示し  
た。麦芽抽出寒天培地の中心に接種し、25℃で14日  
間培養した時の生育はやや抑制的で、直径3.0~3.  
5cmに拡がった。集落の表面はフェルト状で、放射状  
の溝を生じ、赤色味茶色から黒色であった。また赤色の  
可溶性色素を生産した。集落裏面は暗茶色であった。分  
生子殻を豊富に生じた。同様の培養をポテト・デキスト  
ロース寒天培地上で行った時は、生育は抑制的であった

(直径2.5~3.0cm)。集落表面は平坦からコッ  
トン状で、放射状の溝を形成し、赤色味茶色から黒色で  
あった。また、赤色の可溶性色素を生産した。集落裏面  
は灰色味赤色から黒色であった。分生子殻が豊富に見ら  
れた。

【0027】形態的特徴の観察は、加圧滅菌した葉上で  
の生育をもとに行った。分生子殻は、表在性、暗茶色、  
球形、開孔性で、剛毛を持ち、多角菌組織の細胞1-2  
層の薄壁から成り、直径60μmまでであった。剛毛は、  
隔壁はなく、暗茶色、いぼ状、長さ25μmまでで、巾  
3.5-4.5μmであった。分生子柄は観察されず、  
フィアライドが分生子殻に配列した。フィアライドはと  
っくり形、長さ4.0-9.0μmで、基部は巾3.0  
-4.0μm、細くなった先端は巾0.5-2.0μm  
であった。フィアライドから無色の分生子が形成され  
た。分生子は1細胞、滑面、亜球形で、3.0-3.5  
×2.5-3.0μmであった。栄養菌糸は隔壁をも  
ち、茶色、粗面、分枝する。菌糸細胞は円筒形またはた  
る形で、巾2.0-4.0μmである。

【0028】No. 16775株は7~32℃で生育可  
能で、最適生育温度は22~25℃である。(ポテト・  
デキストロース寒天培地上で測定した)。

【0029】上記の特徴からNo. 16775株はケト  
アスポリシア・エリシホイデス・スベガッチーニ(*Ch*  
*aetobolisia* *erysiphoides*  
*Spegazzini* 1918)に所属すると思わ  
れた(1)。従って、この生産株をケトアスポリシア・  
エリシホイデスNo. 16775 (*Chaetobolisia*  
*erysiphoides* No. 167  
75)と命名した。

【0030】No. 16775株の培養上の特徴を、下  
記表2の第1表にまとめて示す。

【0031】

【表2】

第1表 No. 16775株の培養上の特徴

培 地	培 養 上 の 特 徴
麦芽抽出寒天	生育：やや抑制的、直径3.0-3.5cm 表面：円形から不規則で、放射状の溝を生じ、フェルト状、分生子殻を豊富に形成する。赤色の可溶性色素を生産する。赤色味茶色(958)から黒色 裏面：暗茶色(9F8)
ポテト・デキストロス寒天	生育：抑制的、直径2.5-3.0cm 表面：円形で、放射状の溝を生じ、平坦からコットン状、分生子殻を豊富に形成する。赤色の可溶性色素を生産する。赤色味茶色(9D7)から黒色 裏面：灰色味赤色(9B6)から黒色
ツァベック・ドックス寒天	生育：抑制的、直径2.5-3.0cm 表面：円形で、放射状の溝を生じ、平坦からフェルト状、分生子殻を豊富に形成する。赤色の可溶性色素を生産する。赤色味茶色(10E6)から黒色 裏面：赤色味茶色(9D6)から黒色
サブロー寒天	生育：抑制的、直径2.5-3.0cm 表面：円形で、放射状の溝を生じ、フェルト状、分生子殻を形成する。赤色の可溶性色素を生産する。暗茶色(9F4)から茶色(9F4)から灰色(1E1) 裏面：暗茶色(9F6)
オートミール寒天	生育：抑制的、直径1.5-2.0cm 表面：円形で、平坦、分生子殻を豊富に形成する。黒色 裏面：黄色味灰色(3C2)
Y p S a 寒天	生育：抑制的、直径1.5-2.0cm 表面：円形で、放射状の溝を生じ、平坦、分生子殻を豊富に形成する。黒色 裏面：暗灰色(1F1)
コーンミール寒天	生育：抑制的、直径1.5-2.0cm 表面：円形で、平坦、分生子殻を形成する。オリーブ色の可溶性色素を生産する。オリーブ色(1F8) 裏面：オリーブ色(1F8)

【0032】以上の特徴は、25℃で、14日間培養後に観察した。色調の記載は、メチューン・ハンドブック・オブ・カラー (Methuen Handbook of Colour) をもとにして行った(2)。

\* 【0033】上記において参考にした文献は、下記表3のとおりである。

【0034】

\* 【表3】

—参考文献—

- (1) ビー・シー・サットン著、ザ・シーロマイセーテス、コモンウェルス・マイクログル・インスティテュート、スリー、1980年 (B. C. Sutton: The Coelomycetes, Commonwealth Mycological Institute, Surrey, 1980)
- (2) エイ・コーナラップ・アンド・ジェイ・エッチ・ウォンスチャー著、メチューン・ハンドブック・オブ・カラー、3版、メチューン社、ロンドン、1983年 (A. Kornerup and J. H. Wanscher, Methuen Handbook of Colour, Third ed., Methuen, London, 1983)

【0035】本発明に係るWF16775物質は、ケトアスポリシア属に属する該物質生産菌(例えば、*Chaetobolisia erysiphoides* No. 16775)を資化する炭素及び窒素源を含む栄養培地中に接種し、好気条件下で培養することにより、(例えば、振とう培養、通気攪拌培養等)、生産せしめることができる。

【0036】炭素源としては、グルコース、シュクロース、澱粉、フラクトース、グリセリンその他の炭水化物を使用するのが好ましい。

【0037】窒素源としては、オートミール、イーストエキストラクト、ペプトン、グルテンミール、綿実粉、大豆ミール、コーンステイプリカー、乾燥イースト、小麦胚芽、落花生粉、チキン骨肉ミール等を使用するの

が好ましいが、アンモニウム塩（例えば、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等）、尿素、アミノ酸等の無機及び有機の窒素化合物も有利に使用することができる。

【0038】これらの炭素源及び窒素源は、併用するのが有利であるが、純粋なものを必ずしも使用する必要はない。不純なものには、生長因子や微量要素が含まれているからである。

【0039】必要ある場合には、例えば次のような無機塩類を培地に添加してもよい：炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、ヨウ化ナトリウム、ヨウ化カリウム、マグネシウム塩、銅塩、コバルト塩等。

【0040】特に、培地が強く発泡するのであれば、必要あるときに、液体パラフィン、動物油、植物油、鉱物油、シリコン等を添加してもよい。

【0041】目的物質を大量に工業生産するには、他の発酵生産物の場合と同様に、通気攪拌培養するのが好ましい。少量生産の場合は、フラスコを用いる振とう培養が好適である。

【0042】また、培養を大きなタンクで行う場合、WF16775物質の生産工程において菌の生育遅延を防止するため、はじめに比較的少量の培地に生産菌を種培養した後、次に培養物を大きな生産タンクに移してそこで生産培養するのが好ましい。この場合、前培養ないし種培養に使用する培地及び生産培養ないし本培養に使用する培地の組成は、両者ともに同一であってもよいし必要あれば両者を変えてもよい。

【0043】培養は通気攪拌条件で行うのが好ましく、例えばプロペラやその他機械による攪拌、ファーマンターの回転または振とう、ポンプ処理、空気の吹き込み等既知の方法が適宜使用される。通気用の空気は滅菌したものをを用いる。

【0044】培養温度は、本WF16775物質生産菌が本物質を生産する範囲内で適宜変更しうるが、通常は1〜40℃、好ましくは7〜32℃、特に好ましくは22〜25℃で培養するのがよい。培養時間は、培養条件や培養量によっても異なるが通常は約1日〜1週間である。

【0045】醗酵終了後、培養物から目的とするWF16775物質を回収する。すなわち、菌体は、直接水及び／又は有機溶媒による抽出、あるいは、これを機械的に又は超音波等既知の手段を用いて破壊した後、水及び／又は有機溶媒で抽出した後、常法にしたがって回収、精製する。培養液の場合は、直接、常法にしたがって回収、精製すればよい。

【0046】回収、精製方法としては、例えば、水、有機溶媒、これらの混合溶媒による溶媒抽出；クロマトグラフィー；単一溶媒又は混合溶媒からの再結晶等常法が適宜単独であるいは組合わせて使用できる。

【0047】WF16775物質の回収、精製は上記のように既知の方法を適宜利用して行うが、例えば次のようにしてもよい。まず、培養物、例えば菌系のアセトン抽出液を、酢酸エチル、ヘキサン、またはこれらの混合溶媒で抽出し、抽出液を必要あれば蒸発又は蒸留して濃縮する。濃縮液及び／又は抽出液には、WF16775-A<sub>1</sub>及びA<sub>2</sub>の双方が含まれているので、これらを分離しないで使用する場合には、この濃縮液及び／又は抽出液をそのままあるいは常法にしたがって精製した後、使用すればよい。

【0048】また、WF16775-A<sub>1</sub>及びA<sub>2</sub>をそれぞれ分離精製する場合は、上記によって得た抽出液及び／又は濃縮液を更に精製処理し、例えばクロマトグラフィ処理によってこれらA<sub>1</sub>及びA<sub>2</sub>成分をそれぞれ含有するフラクションに分離すればよく、また更に純度の高い物質を得るためには、クロマトグラフィ処理、抽出処理、再結晶処理等、常法にしたがって精製処理を行えばよく、必要あれば更に凍結乾燥等を行ってもよい。このようにして、WF16775-A<sub>1</sub>及びA<sub>2</sub>を純粋な形で得ることができる。

【0049】このようにして得たWF16775物質（A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>及びこれらの混合物も含む）は、遊離の形で使用するほか、例えば次のような塩基で処理するといった常法によって薬剤上許容できる塩の形で使用してもよく、これらの塩類も本発明の権利範囲に包含される。

【0050】塩基として好適なもの例は次のとおりである：アルカリ金属（例えばナトリウム、カリウム等）、アルカリ土金属（例えばマグネシウム、カルシウム等）、これらの水酸化物又は炭酸塩、アルカリ金属アルコキサイド（例えばナトリウムメトキサイド、ナトリウムエトキサイド、カリウムt-ブトキサイド等）その他。

【0051】本発明に係る薬剤組成物は、WF16775物質（A<sub>1</sub>、及び／又はA<sub>2</sub>）及び／又はその塩を有効成分としてこれに常用される無機又は有機の担体を加えて、固体、半固体又は液体の形で、経口投与剤のほか、外用剤等の非経口投与剤に製剤化する。

【0052】経口投与のための製剤としては、錠剤、丸剤、顆粒剤、軟・硬カプセル剤、散剤、細粒剤、粉剤、乳濁剤、懸濁剤、シロップ剤、エリキシル剤等が挙げられる。非経口投与のための製剤としては、注射剤、点滴剤、輸液、軟膏、ローション、トニック、スプレー、懸濁剤、油剤、乳剤、坐剤等が挙げられる。本発明の有効成分を製剤化するには、常法にしたがえばよく、界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張剤その他常用される佐薬を適宜使用する。

【0053】本発明に係る薬剤組成物の投与量は、その種類、治療ないし予防対象疾病の種類、投与方法、患者の年齢、患者の症状、処理時間等によって相違するが、



静脈投与の場合は成人ひとり当たり1日に有効成分(WF 16775物質及び/又はその塩類)を0.1~100 mg/kg投与し、筋肉投与の場合は同じく0.1~100 mg/kg投与し、経口投与の場合も同じく1~1000 mg/kgの範囲内で投与する。

【0054】以下、本発明を実施例合について更に詳しく説明する。

【0055】

【実施例1】

【0056】

【(1) 醗酵生産】500ml容エルレンマイヤーフラスコ48本に下記の表4に示す種培養培地7.71を等分に分注し、120℃で30分間滅菌した。この各々の培地に、*Chaetobolisia erysi* *phoides* No. 16775 (FERM P-1 1873) 株の斜面培養物を1白金耳ずつ接種し、25℃で3日間ロータリーシーカー(220rpm、約5.1cmストローク)で培養した。

【0057】

【表4】

種培養培地

シュクロース	4 (%)
綿実粉	2
ペプトン	1
乾燥イーストエキストラクト	1
CaCO <sub>3</sub>	0.2
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2

【0058】次に、下記の表5に示す本培養培地を2001容のファーメンター3基に1501ずつそれぞれ注入し、120℃で30分間滅菌した後、上記で得た前培養物全量を3等分し、これらをそれぞれ接種し、25℃で7日間培養した。攪拌は200rpm、通気量は1501/分、且つ1.0kg/cm<sup>2</sup>、以上の加圧下で培養を行った。

【0059】

【表5】

本培養培地

可溶性澱粉	2 (%)
シュクロース	2
鶏肉、骨粉	1
乾燥イーストエキストラクト	0.5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2
MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.2
CaCO <sub>3</sub>	0.2
ZnSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O	0.1

【0060】菌体量は、3000rpmで10分間遠心

分離した後に定量した。検定サンプルとしては、全ブロス抽出液(等量のアセトンを加えた後、室温で1時間抽出したもの)を用い、その活性は、内皮細胞を使用する管腔形成試験によってモニターした。

【0061】

【(2) 分離精製】上記によって得た発酵ブロスを、濾過助剤としてケイソウ土10kgを用いて濾過した。得られた菌体(湿重量54kg)を、50lのアセトンを用いて2回抽出した。アセトンを減圧下で蒸発させ、得られた水溶液に6N HClを加えてpHを4に調節した。酢酸エチル20lを用いて3回抽出を行い、次いで減圧下濃縮し、これをNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥し、その結果、油状物質を得た。

【0062】得られた油状物質を2lのシリカゲル(70-230メッシュ、メルク社)とともに乾燥し、得られた粉末を、上記と同一のシリカゲルをn-ヘキサン中で充填した1lのカラムに付した。次いでこのカラムを、n-ヘキサンと酢酸エチルの各混合溶液(1:0; 8:1; 4:1; 3:1; 2:1; 1:1)を各段階において各々カラム容量の3倍量(9l)を使用して、段階的に溶出した。n-ヘキサンと酢酸エチルの8:1及び3:1混液で溶出した。フラクションに活性が認められたので、これらのフラクションを合し、これを減圧下濃縮して、油状物質56.3gを得た。

【0063】この油状物質を150mlのシリカゲルとともに再度乾燥し、次いでこれを、上記と同じシリカゲルをn-ヘキサンで充填した1lのカラムに再度付した。上記したのと同じ混合溶媒を用いて段階的に展開した結果、n-ヘキサンと酢酸エチルの3:1及び2:1混液中に活性化化合物が溶出された。これを減圧下濃縮して、黄褐色油状物質13.6gを得た。

【0064】この油状物質を340mlのエタノールで希釈した後、水510mlを加えた。黄色沈澱が生成したので、これに1N NaOHを加えてpHを7.5に調節することにより、これを再度溶解し、その結果赤色の溶液を得た。一方、YMCゲル(ODS-AM 120-S50、山村化学研究所(株)製)を、10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7)含有40%メタノール水中で1lカラムに充填しておき、このYMCゲルカラムに上記赤色溶液を適用した。上記メタノール水6lを用いてカラムを洗滌した後、活性化化合物は、10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7)含有50%メタノール水で溶出された。同時に、HPLC(カラム:YMC-AM 303 S-5 120A ODS(山村化学研究所(株)製)、溶媒:10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7)含有65%メタノール水、流速:1.0ml/分、検出:210nm)を用いて、上記の溶出液をモニターした。その結果、保持時間10.1分及び14.6分のところにそれぞれ活性化化合物が検出された。これら

2つの活性化化合物の中、前者をWF16775-A

1 (=FR-901448)そして後者をWF16775-A<sub>2</sub> (=FR-901449)とそれぞれ命名した。

【0065】WF16775-A<sub>1</sub>は700ml~3700mlのフラクション(フラクションI)に溶出され、他方、WF16775-A<sub>2</sub>は4000ml~8300mlのフラクション(フラクションII)に溶出された。

【0066】フラクションI(WF16775-A<sub>1</sub>を1270mg含有)を合し、そして最終濃度が35%メタノール水となるよう水を加え、次いで次のようにして再度クロマトグラフィー処理を行った。すなわち10mMリン酸カリウム緩衝液(pH7)含有40%メタノール水で充填した1lのYMCゲルカラムに、上記サンプルを負荷した。上記水性メタノール溶媒6lを用いてカラムを洗滌した後、45%メタノール水によって該化合物が溶出された。減圧下この活性フラクション(WF16775-A<sub>1</sub>を1176mg含有)からメタノールを除去した後、1N HClを用いてそのpHを4に調節した。

【0067】得られた懸濁液を、n-ヘキサン:酢酸エチル(1:2)混液で5回(該混液を各等量ずつ使用)抽出し、乾燥した。得られた赤色油状物質(1547mg)を、n-ヘキサン:酢酸エチルの(6:1)熱混液中に再度溶解し、これを、上記と同じ溶媒を用いて充填した150mlのシリカゲルカラムに適用した。

【0068】このカラムを、上記溶媒を用いてWF16775-A<sub>1</sub>の溶出が完結するまで、十分に展開した。溶媒を減圧下で除去し、薄黄色油状残渣を少量の熱n-ヘキサン中に再溶解した。この溶液を室温に1夜放置したところ、白色針状を呈する結晶が822mg得られた。

【0069】また一方、赤色を呈するフラクションII(WF16775-A<sub>2</sub>を328mg含有)については、最終濃度が40%メタノール水となるよう水で希釈し、1lのYMCゲルカラム上で再度クロマトグラフィー処理を行なった。10mMのリン酸カリウム緩衝液(pH7)含有40%メタノール水5lを用いて、このカラムを洗滌した後、10mMの上記緩衝液含有50%メタノール水を用いてWF16775-A<sub>2</sub>溶出した。

【0070】純度95%以上のフラクションを合し、これを減圧下で濃縮してメタノールを除去した。この活性物質をpH7下でn-ヘキサンを用いて抽出し、薄黄色の抽出液を得た。これを濃縮して、WF16775-A\*

\*<sub>2</sub>の無色針状結晶を273mg得た。

【0071】

【実施例2】実施例1で製造したWF16775-A<sub>1</sub>及び同A<sub>2</sub>物質(それぞれ単にA<sub>1</sub>及びA<sub>2</sub>ということもある)について、血管内皮細胞に対する管腔形成阻害を測定して、血管新生阻害活性のほか、更に抗腫瘍活性も確認し、併せて安全性も確認した。

【0072】

【(1)管腔形成阻害活性】内皮細胞はウシ頸動脈由来のものを用い、10%FBS(ウシ胎児血清)を含むイーグルMEM(最少必須)培地にて培養したものをトリプシン処理して集めた。96穴マイクロタイタープレートの各穴に中性化したタイプIコラーゲンを加えてゲル化し、10%FBS添加MEM培地に懸濁した内皮細胞1.5×10<sup>4</sup>個をゲル上に播種した。CO<sub>2</sub>インキュベーターで3日間培養後、血清を含まないMEM培地と培地交換し、そこへサンプルおよびbFGF(20ng/ml)を添加して培養を続けた。3日後、管腔様構造の発達程度を顕微鏡により観察した。

【0073】その結果、管腔形成に対するMIC値は下記の表6のとおりであった。

【0074】

【表6】

$$A_1: 7.8 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$$

$$A_2: 2.0 \times 10^{-2} \mu\text{g/ml}$$

【0075】なお、この際内皮細胞に対してA<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>とも10μg/mlの濃度で細胞毒性は示さなかった。

【0076】

【(2)細胞毒性】ウシ頸動脈血管内皮細胞は、10%FBSを含むイーグルMEM培地にて培養したものをトリプシン処理して集めた。マウスリンパ腫EL-4細胞は、10%FBSを含むダルベッコ培地にて培養した。また、マウス線維肉腫Meth A細胞はBalb/cマウス(雌、8週令)腹腔中で継代したものを、10%FBSを含むダルベッコ培地に懸濁した。96穴マイクロタイタープレートの各穴に上記培地に懸濁した細胞をそれぞれ1×10<sup>4</sup>個加え、そこへサンプルを添加してCO<sub>2</sub>インキュベーター中、内皮細胞あるいはMeth A細胞の場合は72時間、EL-4細胞の場合は48時間培養した後、顕微鏡により細胞の生育を観察した。

【0077】その結果、細胞増殖に対するMIC値は下記の表7のとおりであった。

【0078】

【表7】

	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>
ウシ頸動脈内皮細胞	$1.6 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$	$2.0 \times 10^{-3} \mu\text{g/ml}$
マウスリンパ腫細胞EL-4	$1.6 \times 10^{-3}$	$1.6 \times 10^{-3}$
マウス線維肉腫Meth A	$1.6 \times 10^{-3}$	$6.4 \times 10^{-3}$

【0079】なお、これらの作用は内皮細胞、Meth A細胞に対してはcytostaticであったが、

EL-4細胞に対してはcytotoxicであった。

【0080】

【(3) 抗菌活性】抗菌活性は、検定菌として細菌を用いる場合はブイヨン培地を、酵母およびかびを用いる場合はサブロー培地を使用して、サンプルを希釈した後、ペーパーディスク寒天拡散法によってMIC値を測定した。その結果を下記の表8に示した。

【0081】

【表8】

	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>
<i>Escherichia coli</i>	>1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	>1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$
<i>Bacillus subtilis</i>	>1000	>1000
<i>Staphylococcus aureus</i>	>1000	1000
<i>Candida albicans</i>	>1000	>1000
<i>Aspergillus niger</i>	3.1	50

【0082】

【(4) 急性毒性】Balb/cマウス(雌、8週令、n=2)を用いた腹腔内投与によるLD<sub>50</sub>値はA<sub>1</sub>が5mg/kg、A<sub>2</sub>が10mg/kgであった。またBalb/cマウス(雌、8週令、n=5)を用いたA<sub>2</sub>による腹腔内5日間連続投与では、3mg/kg以下の濃度でコントロール並の体重増加がみられた。

【0083】

【(5) 血管新生阻害作用】*in vivo*における血管新生阻害作用を鶏胚漿尿膜(CAM)法により検討した。アッセイはN. G. Tanakaらの方法(Exp. Pathol. 30, 143, 1986)に多少の改良を加えて行った。すなわち3日令の受精卵より卵白を約3ml抜き取った後、卵殻に約1cm四方の小窓をあけ、卵殻膜を除去してCAMを露出させた。次いで、小窓をふさいで2日間孵卵後、5日令のCAM上にシリコリング(内径3mm、外径5mm、厚さ1mm:池田理化)のをせ、その中にあらかじめR. Langerの方法(Nature 263, 797, 1979)により作製しておいた本化合物0.1~10 $\mu\text{g}$ を含む徐放性ペレットを置いた。小窓をふさいでさらに2日間孵卵後、漿尿膜腔内に適量の10%脂肪乳剤(イントラリポス、ミドリ十字)を注入してCAM上の血管を見やすくした後、実体顕微鏡下でサンプルペレットのまわり

に生じた血管新生阻害ゾーンを観察した。

【0084】血管新生阻害活性(パーセント)は、試験された総検体当りの血管新生阻害ゾーンを形成した検体数として算出した。なお、各群において8~10個の受精卵を用いた。

【0085】その結果、本化合物は下記表9の第2表に示すように、いずれも濃度依存的にCAMにおける血管新生を阻害した。

【0086】

【表9】

第2表 本化合物の血管新生阻害活性

試験化合物 ( $\mu\text{g}/\text{卵}$ )	血管新生阻害活性 (%)
VF16775-A <sub>1</sub> 5	80
2	80
1	67
0.5	50
0.2	17
0.1	17
VF16775-A <sub>2</sub> 5	Toxic
2	100
1	86
0.5	67
0.2	40
0.1	33

【0087】

【(6) 抗腫瘍活性】マウス線維肉腫Meth A細胞をBalb/cマウス(雌、8週令)腹腔中で継代し、8日後にその細胞を1 $\times 10^5$ 細胞Balb/cマウスに皮内移植した。本化合物はday 0~3、day 6~10およびday 13に各濃度で腹腔内投与し、経時的に腫瘍サイズを測定した。なお、相対的腫瘍重量はNCI(USA)のマニュアルにより算出した。その結果を下記表10の第3表に示した。

【0088】

【表10】

第3表 本化合物のMeth Aに対する抗腫瘍活性

腫瘍重量 (mg)		
	day 8	day 14 (阻害率)
コントロール	285.8 $\pm$ 32.4	1066.7 $\pm$ 154.9(-)
VF16775-A <sub>2</sub> 3mg/kg	201.3 $\pm$ 41.5	774.4 $\pm$ 159.0(27%)
1	183.4 $\pm$ 28.7	725.7 $\pm$ 126.0(32%)

\* 平均 $\pm$ 標準誤差、n=8

【0089】以上の結果から、WF16775物質はすぐれた血管新生阻害作用及び抗腫瘍作用を有することが判明した。すなわち、*in vivo*血管新生作用評価系である鶏卵漿尿管assay系において、A<sub>1</sub> (0.5~5 $\mu$ g/egg) およびA<sub>2</sub> (0.2~2 $\mu$ g/egg) の濃度で阻害し、その強度は強いことが確認された。

【0090】また、マウスの固形癌Meth A (id $\rightarrow$ ip投与) で1~3mg/kgで、腫瘍の増殖の抑制傾向が認められた。

【0091】したがって、WF16775物質は、例えば血管新生の阻害や癌の予防治療に有用であることがわかった。

【0092】

【実施例3】下記表11に示す原料を用いて錠剤を製造した。

【0093】

【表11】

(1) 実施例1で製造した物質A <sub>1</sub>	50g
(2) ラクトース	90g
(3) コーンスターチ	29g
(4) ステアリン酸マグネシウム	1g

【0094】すなわち、(1)、(2)及び(3) (但し17g)を混合し、(3) (但し7g)から調整したペーストとともに顆粒化した。得られた顆粒に(3) (但し5g)と(4)を加えてよく混合し、この混合物

を圧縮錠剤機により圧縮して、1錠あたり有効成分(1)を50mg含有する錠剤1000個を製造した。

【0095】

【実施例4】下記表12に示す原料を用いて注射剤を製造した。

【0096】

【表12】

(1) 実施例1で製造した物質A <sub>2</sub>	5g
(2) 食塩	9g
(3) クロロブタノール	5g
(4) 炭酸水素ナトリウム	1g

【0097】すなわち、(1)~(4)の全成分を蒸留水1000mlに溶解した後、アンプルに1mlずつ分注して、注射剤1000本を製造した。

【0098】

【発明の効果】本発明はWF16775-A<sub>1</sub>及びA<sub>2</sub>物質 (FR-901448及びFR-901449) を提供するものであるが、これらの物質はすぐれた血管新生阻害作用を示し、医薬、例えば癌や腫瘍の予防及び/又は治療剤として、非常に有用である。また、FR-901449物質は新規物質でもあるので、化合物の面からも更に新しい発明が展開されることが大いに期待される。

【0099】また、本発明によって、微生物を利用する上記物質の工業的製法も確立された。

フロントページの続き

(72)発明者 寺野 紘

茨城県つくば市吾妻4 -16-4 プレビ  
ユー吾妻101